

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. Juni 2005 (23.06.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/055877 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61F 2/00

(74) Anwälte: LANGE, Sven usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig  
& Schneider, Wallstr. 58/59, 10179 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/002761

(22) Internationales Anmeldedatum:  
13. Dezember 2004 (13.12.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 59 830.8 12. Dezember 2003 (12.12.2003) DE  
60/544,315 17. Februar 2004 (17.02.2004) US  
10 2004 043 449.2  
6. September 2004 (06.09.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): CO.DON AG [DE/DE]; Warthestr. 21, 14513 Teltow  
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JOSIMOVIC-ALA-  
SEVIC, Olivera [DE/DE]; Schwendener Str. 53,  
14195 Berlin (DE). LIBERA, Jeanette [DE/DE]; Wil-  
helm-Wolff-Str. 25a, 13156 Berlin (DE). SIODLA, Vilma  
[DE/DE]; Ernst-Thälmann-Str. 57, 14532 Kleinmachnow  
(DE). MEISEL, Hans-Jörg [DE/DE]; Salzachstr. 14,  
14163 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,  
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF INTERVERTEBRAL DISK CELL TRANSPLANTS AND USE THEREOF  
AS TRANSPLANT MATERIAL

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BANDSCHEIBENZELLTRANSPLANTATEN UND DEREN  
ANWENDUNG ALS TRANSPLANTATIONSMATERIAL

(57) Abstract: The invention relates to a method for the in vitro production of intervertebral disk cartilage cell transplants from patients with diseased intervertebral disk tissue and to the use thereof as transplant material for the treatment of diseased intervertebral disks. The invention also relates to three-dimensional, vital and mechanically stable intervertebral disk cartilage tissue and to the use thereof as transplant material for the treatment of diseased intervertebral disks, and to the testing of active substances. The invention further relates to the operative technique which is used to introduce the transplants, the produced intervertebral disk cell transplants and the produced intervertebral disk cartilage tissue and therapeutical preparations, e.g. injection solutions which contain said tissue and the cell transplants.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro Herstellung von Bandscheibenknorpelzelltransplanta-  
ten aus erkranktem Bandscheibengewebe von Patienten und dessen Anwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von  
erkrankten Bandscheiben. Die Erfindung betrifft weiterhin dreidimensionales, vitales und mechanisch stabiles Bandscheibenknor-  
pelgewebe und dessen Verwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von erkrankten Bandscheiben sowie zur Testung  
von Wirkstoffen. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die operative Technik zum Einbringen der Transplantate, die herge-  
stellten Bandscheibenzelltransplantate und die hergestellten Bandscheibenknorpelgewebe und therapeutische Zubereitungen, z.B.  
Injektionslösungen, die dieses Gewebe und die Zelltransplantate beinhalten.

WO 2005/055877 A2

5

---

Verfahren zur Herstellung von  
10 Bandscheibenzelltransplantaten und deren Anwendung als  
Transplantationsmaterial

---

15

### Beschreibung

20

25

30

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro  
Herstellung von Bandscheibenknorpelzelltransplantaten aus  
erkranktem Bandscheibengewebe von Patienten und dessen  
Anwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von  
erkrankten Bandscheiben. Die Erfindung betrifft weiterhin  
dreidimensionales, vitales und mechanisch stabiles  
Bandscheibenknorpelgewebe und dessen Verwendung als  
Transplantationsmaterial zur Behandlung von erkrankten  
Bandscheiben sowie zur Testung von Wirkstoffen. Gegenstand  
der Erfindung sind weiterhin die hergestellten  
Bandscheibenzelltransplantate und die  
Transplantationstechnik und die hergestellten  
Bandscheibenknorpelgewebe und therapeutische Zubereitungen,  
z.B. Injektionslösungen, die dieses Gewebe und die  
Zelltransplantate beinhalten.

35

Die Degeneration der Bandscheiben wird während der Alterung  
oder durch Trauma ausgelöst und induziert akute und  
chronische Schmerzen und Instabilitäten in der Wirbelsäule.  
Mehr als 300.000 Patienten in Europa leiden an

5 Bandscheibenerkrankungen. Ungefähr 70 % der Patienten, die  
einen Bandscheibenvorfall erleiden und mittels Discectomie  
behandelt werden, leiden weiterhin an Rückenschmerzen.  
Anhaltende starke Schmerzen machen bei 10 % dieser  
Patienten eine weitere operative Behandlung notwendig  
10 (Yorimitsu et al, 2001). Grund dafür ist die durch die  
Operation bedingte Abnahme der Bandscheibenhöhe, die damit  
verbundene Erhöhung der lokalen Belastung des  
Bandscheibengewebes (Brinckmann und Grootenboer, 1991) und  
vor allem die fehlende Heilung und Regeneration des  
15 zerstörten und entfernten Bandscheibengewebes (Lundon und  
Bolton, 2001, Meakin et al., 2001). Mit fortschreitender  
Zeit resultiert diese Instabilität der betroffenen  
Bandscheibe in degenerativen Veränderungen angrenzender  
Bandscheiben, wodurch weitere operative Eingriffe und im  
20 schlimmsten Fall eine Fusion der Wirbelkörper oder das  
Einsetzen einer Prothese notwendig werden. Deshalb ist die  
biologische Reparatur bzw. Regeneration der Bandscheibe die  
Zukunft für die Behandlung degenerierter Bandscheiben.

25 Eine bekannte Methode zur biologischen Regeneration eines  
Gewebes ist die Knorpelzelltransplantation unter Verwendung  
von körpereigenen Zellen, die zur Behandlung von  
Gelenksknorpeldefekten angewandt wird. Dabei wird das  
Potential der Gelenksknorpelzellen genutzt, um *in vivo* nach  
30 Transplantation der Zellen neues Gewebe aufzubauen. Dazu  
wird dem Patienten eine Gelenksknorpelbiopsie entnommen,  
daraus Knorpelzellen isoliert, mittels Zellkultivierung  
vermehrt und anschließend dem Patienten im Bereich des  
Gewebedefektes, z.B. durch Einspritzen, transplantiert.  
35 Dort bilden sie neues Gewebe und füllen somit den Defekt  
vollständig auf. Durch diese Verfahren wird erreicht, dass

5 nach Applikation eines Zelltransplantates im Körper Gewebe  
aufgebaut wird. Prinzipiell ist diese Methodik für die  
Behandlung der Bandscheibendegeneration nicht anwendbar, da  
den Patienten aus ethischen Gründen kein Ausgangsmaterial  
aus einer intakten benachbarten Bandscheibe entnommen  
10 werden kann und krankes Gewebe a priori nicht verwendbar  
ist.

Erste Ansätze zum biologischen Ersatz der Bandscheibe gehen  
von der Verwendung von gesundem Bandscheibengewebe aus. So  
15 beschreiben Handley (US 6,080,579) und Ferree (US 6,340,369  
B1) die Verwendung von normalem Bandscheibengewebe für die  
Isolation von Bandscheibenzellen und die Kombination dieser  
Zellen mit einem bioresorbierbaren Träger. Auch viele  
wissenschaftliche Arbeiten haben die Verwendung von  
20 normalem Bandscheibengewebe als Grundlage: Okuma et al.,  
2000, Gruber et al., 2000, Chelberg et al., 1995. Jedoch  
kann eine gesunde Bandscheibe eines Patienten nicht als  
Gewebequelle zur Behandlung einer anderen Bandscheibe  
dienen, da die Gewebeentfernung zu einer Zerstörung, zur  
25 Degeneration und somit zum Verlust der Funktion dieser  
Bandscheibe führt.

Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von degeneriertem  
Nukleus Pulposus Gewebe, welches aus dem Inneren einer  
degenerierten Bandscheibe entfernt und aufgearbeitet wird.  
30 Bei diesem operativen Eingriff wird die ohnehin schon  
degenerierte und zerstörte Bandscheibe noch weiter  
zerstört. Die Aufarbeitung des Gewebes wird dabei zum einen  
vorgeschlagen als Dehydrierung (US 6,648,918) oder die  
Kombination von darin befindlichen Zellen mit einem  
35 Trägermaterial (US 6,569,442; US2001/0020476 A1) und die

5       anschliessende Transplantation zurück in diese  
degenerierten Bandscheiben. Allerdings enthält das  
dehydrierte Gewebe keine lebenden Zellen und stellt somit  
keine Methode der biologischen Regeneration dar. Die  
vorgeschlagene Kombination der Nukleus Zellen oder anderer  
10       Zellen mit einem Trägermaterial stellt ebenfalls keine  
reine biologische Methode dar und bedingt die Verwendung  
eines geeigneten Trägermaterials, welches zum Beispiel  
biomechanisch geeignet sein muss, welches im selben Masse  
wie neues Gewebe aufgebaut werden soll abgebaut wird,  
15       welches die Bildung neuen Gewebes nicht behindern darf oder  
zum Beispiel keine immunologische Reaktion aufgrund der auf  
jeden Fall verwendeten synthetischen, allogenen oder  
xenogenen Materialien auslösen darf.

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit wäre die Verwendung von  
20       Bandscheiben anderer Patienten, wobei es sich somit um eine  
allogene Transplantation handelt (6,344,058; Keith DK et  
al., 2003). Hierbei stellt jedoch die immunologische  
Reaktion ein Problem dar und durch die alleinige  
Einbringung einer Spenderbandscheibe wird wahrscheinlich  
25       auch keine biologische Regeneration der betroffenen  
Bandscheibe ausgelöst.

Aus den genannten Problemen bestehen deshalb für die  
Behandlung von degenerierten Bandscheiben und zur  
30       Bandscheiberegeneration die allgemeinen Ziele darin:  
medizinisch und ethisch vertretbares Ausgangsgewebe bzw. -  
zellprobe zu verwenden, keine anderen oder die betroffene,  
erkrankte Bandscheibe des Patienten zu zerstören, nur  
patienteneigene Materialien zu verwenden (autologe  
35       Therapie), optimale Zellisoliationsbedingungen und -

5       kultivierungsbedingungen zur Vermehrung der Bandscheiben-  
      zellkn und anschliessender Bandscheibenmatrixbildung zu  
      finden, zur Vermeidung von Immunreaktionen auf Träger-  
      materialien zu verzichten. Diese Probleme sind lösbar durch  
10       die Transplantation eines speziellen autologen Zelltrans-  
      plantates oder durch Transplantation eines außerhalb des  
      Körpers vorgefertigten 3-dimensionalen Bandscheibenknorpel-  
      gewebes.

      Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb,  
15       Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenknorpelzell-  
      transplantaten und stabilem vitalen Bandscheibenknorpel-  
      gewebe bereitzustellen, die zur autologen Transplantation,  
      zum schnellen Wiederaufbau und der Erhaltung der Funktion  
      der Bandscheibe geeignet sind. Dabei ist es essentiell,  
20       dass das Ausgangsmaterial zur Herstellung der Zelltrans-  
      plantate medizinisch und ethisch vertretbar entnommen  
      werden kann sowie, dass die autolog kultivierten  
      Bandscheibenzellen ihre Eigenschaften über den Zeitraum von  
      der Entnahme bis zur Transplantation nicht verändern und  
25       eine hohe Proliferations- und Differenzierungskapazität  
      aufweisen.

      Überraschend konnte gezeigt werden, dass als  
      Ausgangsmaterial erkranktes Bandscheibengewebe verwendet  
30       werden kann. Bisher wurde angenommen, dass es nicht möglich  
      ist, aus degeneriertem Gewebe, adulte Zellen in  
      ausreichender Anzahl zu isolieren, die vital sind,  
      ausreichend proliferieren und anschließend auch noch in der  
      Lage sind, gewebespezifisch zu differenzieren und  
35       Bandscheibengewebe aufzubauen, da in Geweben, die einer

5 Degeneration unterliegen die gewebespezifische Zellen ihre  
Eigenschaften im Hinblick auf die Matrixsynthese verändern  
und auch absterben und auch durch andere Zellen mit anderen  
gewebe-unspezifischen Eigenschaften ersetzt werden.  
Überraschenderweise konnte jedoch insbesondere aus  
10 vorgefallenem degenerierten Bandscheibengewebe eine  
ausreichende Anzahl an vitalen Zellen isoliert werden. Das  
vorgefallene degenerierte Bandscheibengewebe besteht aus  
Bandscheibenteilen des Anulus Fibrosus und Nucleus  
Pulposus, wobei die aus beiden Gewebebereichen isolierten  
15 Zellen (Anulus Fibrosus Zellen und Nucleus Pulposus Zellen)  
unter den gegebenen autologen Kulturbedingungen dann auch  
noch proliferieren und gewebespezifisch besonders  
spezifisch differenzieren. Damit sind diese  
Gemischzelltransplantate für eine zell-basierte Therapie  
20 zur Wiederherstellung der Funktion der Bandscheibe  
geeignet.

Es ist somit erstmals ein Verfahren beschrieben, durch  
welches besondere autologe Gemisch-Bandscheibenzell-  
25 transplantate hergestellt werden können, die nach  
Transplantation in eine geschädigte/ erkrankte Bandscheibe  
durch den Aufbau neuen Bandscheibengewebes die Erhaltung  
der Bandscheibe und damit die Wiederherstellung der  
neurologischen und mechanischen Funktion der Wirbelsäule  
30 bei einer Bandscheibenerkrankung oder nach einem  
Bandscheibenvorfall erlaubt.

Auch bei fortgeschrittener Degeneration der Bandscheibe,  
d.h. auch bei Degeneration oder traumatischer Schädigung  
35 der äußeren Schicht der Bandscheibe (Anulus Fibrosus), ist

5 durch die vorliegende Erfindung die Wiederherstellung und  
Erhaltung der neurologischen, biologischen und mechanischen  
Funktion der Bandscheibe ermöglicht, wenn aus  
vorgefallenen, degenerierten Bandscheiben Gemisch-  
Gewebezellen isoliert werden, die folgend zu einem  
10 autologen 3-dimensionalen Gewebe ohne die Verwendung von  
Trägermaterialien kultiviert werden. Das isolierte  
Bandscheibengewebe, insbesondere die Bandscheibenzellen,  
werden bevorzugt unter autologen Kultivierungsbedingungen  
nur unter Zusatz von patienteneigenem Serum im  
15 Zellkulturmedium vermehrt. Bevorzugt sind die aus dem  
degenerierten, vorgefallenen Bandscheibengewebe isolierten  
Bandscheibenzellen während der Vermehrung in einem  
Zellkulturmedium, das 1-20% autologen Serumzusatz enthält  
und dessen Verhältnis von alpha-MEM-Medium und  
20 HAM-F12-Medium zwischen 2:1 und 1:2 beträgt, und bei  
36.8-37°C, 5% Kohlendioxid Luftanteil und einer Luftfeuchte  
von 85-95% kultiviert, wodurch sich ihre Synthese an  
Matrix- und Markerproteinen nicht ändert.

25 Bevorzugt ist weiterhin, dass die isolierten  
Bandscheibenzellen nach ihrer Vermehrung in Monolayer in  
einem Zellkulturmedium, das 1-20% autologen Serumzusatz  
enthält und dessen Verhältnis von alpha-MEM-Medium und  
HAM-F12-Medium zwischen 2:1 und 1:2 beträgt, und bei  
30 36.8-37°C, 5% Kohlendioxid Luftanteil und einer Luftfeuchte  
von 85-95% kultiviert und dadurch differenzierungsfähig  
sind und Matrixstrukturen bilden, die spezifische  
Bandscheibenmatrixproteine umfassen.



5       Bevorzugt ist weiterhin, dass die isolierten Bandscheiben-  
zellen nach deren Vermehrung in Monolayer in einer Lösung  
aus 10 % DMSO, 20 % Serum und 70 % Kulturmedium eingefroren  
und wieder aufgetaut werden und so deren Eigenschaften im  
Hinblick auf die Synthese von spezifischen Matrixkompo-  
10       nenten und Markern nicht verändern und Gewebestrukturen in  
vitro und in vivo aufbauen, die aus Bandscheiben-spezifischen  
Matrixproteinen bestehen.

Die beschriebenen Merkmale der nicht veränderten Synthese  
15       von Marker- und Matrixproteinen stellen keine Aufgabe oder  
gewünschte Funktion dar, die erzielt werden soll, sondern  
die Folge der Kultivierungsschritte. Die Nennung dieser  
Merkmale erfolgt lediglich aus Gründen der Klarstellung.  
Mit der Offenbarung dieser Merkmale soll demgemäß  
20       klargestellt werden, welche Folgen die erfindungsgemäßen  
Verwendungs- oder Verfahrensschritte haben.

Die Bildung der Matrixstrukturen, die spezifische Bandscheibenmatrixproteine umfassen, ist daher keine erstrebenswerte Eigenschaft, sondern die Bildung der genannten  
25       Matrixstrukturen ergibt sich aus den Kultivierungsbedingungen.

Bevorzugt werden die die aus dem Bandscheibengewebe  
30       isolierten Zellen in einem Kulturgefäß mit hydrophober  
Oberfläche und sich verjüngendem Boden kultiviert, wodurch  
die dreidimensionalen Zellaggregate erhalten werden.

Bei der Behandlung mit den erfindungsgemäßen  
35       Bandscheibenzelltransplantaten ist es vorteilhaft, wenn vor

5 der Transplantation die äußere Hülle der Bandscheibe, der  
Anulus Fibrosus, der durch den Austritt des  
Bandscheibengewebes geschädigt wurde, in der Art heilt,  
dass keine Flüssigkeit, wie die hergestellten  
Zelltransplantate, aus dem Inneren der Bandscheibe mehr  
10 auslaufen kann. Dieser Zeitraum ist patientenabhängig.  
Während dieses Zeitraumes werden die Bandscheibenzell-  
transplantate hergestellt, wobei die Gemisch-  
Bandscheibenzellen während der Vermehrung in der Zellkultur  
ihre gewebe-spezifischen Eigenschaften im Hinblick auf  
15 deren Differenzierungspotential und damit den Erfolg der  
Transplantation erhalten. Im Gegensatz dazu wird dieses  
Potential bei der getrennten Kultivierung der Anulus  
Fibrosus und Nucleus Pulposus Zellen verringert, wobei nach  
Überführung in die 3-dimensionale Umgebung einige  
20 Bandscheiben-spezifische Marker nicht exprimiert werden.  
Deshalb sind nur die Gemisch-Kulturen besonders geeignet  
Bandscheibengewebe nach deren Transplantation in eine  
degenerierte Bandscheibe aufzubauen.

25 Außerdem sollen die in vitro hergestellten Zell- und  
Gewebetransplantate keine immunologischen Reaktionen im  
Organismus, der das Transplantat erhält, auslösen. Es wurde  
überraschender Weise gefunden, dass diese erfindungsgemäß  
autolog hergestellten Zellen und Gewebe keine  
30 immunologische Reaktionen auslösen.

Das entnommene, patienteneigene erkrankte Bandscheiben-  
gewebe kann unterschiedlich weiter bearbeitet werden:

5 (a) Aus den Biopsien werden die Gemisch-Bandscheibenzellen  
mittels enzymatischem Verdau des Gewebes, durch  
Auswandern oder durch Reagenzien, die Zielzellen  
erkennen, mit üblichen Methoden isoliert. Diese Zellen  
werden dann nur unter Zusatz von körpereigenem Serum  
10 und ohne Zusatz von exogenen wachstumsfördernden  
Verbindungen und ohne den Zusatz von Antibiotika und  
mit üblichem Kulturmedium in Zellkulturgefäßen  
kultiviert und so lange vermehrt, bis eine ausreichende  
Menge an Zellen zur Verfügung steht (Abb. 2). Diese  
15 Zeit wird so kurz wie möglich gehalten, um ihre  
phänotypischen Eigenschaften nicht zu verändern. Nach  
ausreichender Vermehrung der Zellen werden diese  
geerntet und das Zelltransplantat bestehend aus einer  
Bandscheibenzell-suspension ist für therapeutische  
20 Verwendungen bereitgestellt.

Erfindungsgemäß werden die isolierten Bandscheibenzellen im  
Gemisch verwendet, d.h. die Zellen werden nicht nach Anulus  
Fibrosus und Nucleus Pulposus Zellen, deren Gewebeanteile  
25 im vorgefallenen Bandscheibengewebe enthalten sind,  
aufgetrennt und getrennt oder nur als Einzelzellart  
kultiviert. Genau unter diesen Gemisch-Bedingungen wird  
eine spätere verbesserte Bandscheiben-spezifische  
Differenzierung der Zellen erreicht (siehe Abb. 3). Diese  
30 autologe Gemisch-Kultiverungstechnik zur Vermehrung der  
Bandscheibenzellen ermöglicht somit erstmals eine  
Bandscheiben-spezifische Differenzierung dieser so  
kultivierten Zellen, nachdem diese in eine 3-dimensionale  
Umgebung überführt werden.

5 (b) In einem weiteren Verfahren werden die isolierten Bandscheibenzellen vorkultiviert und ohne Passagierung der Zellen nur kurzzeitig vermehrt. Danach werden die vorkultivierten Zellen geerntet und eingefroren und bis zum Zeitpunkt der Transplantation tiefgefroren  
10 gelagert. Vor der Transplantation werden die Zellen aufgetaut und bis zum Erreichen einer ausreichenden Zellzahl mit autologem Serum und in herkömmlichem Zellkulturmedium weiterkultiviert. Nach ausreichender Vermehrung der Zellen werden diese geerntet und das  
15 Zelltransplantat bestehend aus einer Bandscheibenzellsuspension bereitgestellt. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass die Bandscheibenzellen durch das Einfrieren und Auftauen nicht ihre spezifischen Eigenschaften im Hinblick auf  
20 die Synthese von spezifischen Marker- und Matrixproteinen verlieren (siehe Abb. 5).

(c) In einem weiteren bevorzugten Verfahren wird als Ausgangsmaterial ebenfalls patienteneigenes erkranktes  
25 Bandscheibengewebe verwendet. Aus den Biopsien werden die gewebeaufbauenden Zellen aus dem Anulus Fibrosus und Nucleus Pulposus mittels enzymatischem Verdau des Gewebes, durch Auswandern oder durch Reagenzien, die Zielzellen erkennen, mit üblichen Methoden isoliert.  
30 Diese Gemisch-Zellen werden dann unter autologen Bedingungen und mit üblichem Kulturmedium zunächst in Monolayer kultiviert bis eine ausreichende Zellzahl erreicht ist und anschließend in Zellkulturgefäße mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden  
35 überführt und dort so lange in Suspension kultiviert,

5 bis ein dreidimensionales Zellaggregat entsteht, das zu  
mindestens 40 Volumen%, vorzugsweise mindestens  
60 Volumen% bis maximal 99 Volumen%, extrazelluläre, de  
novo synthetisierte Matrix (ECM) beinhaltet, in welche  
differenzierte Zellen eingebettet sind. Der Fachmann  
10 kann diese Werte durch Entnahme kleinerer Proben  
bestimmen. Das entstandene Zellaggregat weist einen  
äußeren Bereich auf, in welchem proliferations- und  
migrationsfähige Zellen vorhanden sind (siehe Abb. 1).

15 Erfindungsgemäß werden die isolierten Bandscheibenzellen im  
Gemisch verwendet, d.h. die Zellen werden nicht nach Anulus  
Fibrosus und Nucleus Pulposus Zellen aufgetrennt und  
getrennt oder nur als Einzelzellart kultiviert. Genau unter  
diesen Gemisch-Bedingungen wird in der 3-dimensionalen  
20 Kultur und damit bei der Bildung der 3-dimensionalen  
Bandscheibengewebe die Bandscheiben-spezifische Differen-  
zierung der Gemischzellen gefördert, wobei die Expression  
von Bandscheiben-spezifischen Markern nur in diesen  
Kulturen erreicht werden kann und die Bildung der 3-  
25 dimensional Bandscheibengewebe bei Verwendung der  
Gemischkulturen gefördert ist (siehe Abb. 3). Diese  
autologe Gemisch-Kultivierungstechnik ermöglicht somit  
erstmal die Herstellung und Verwendung eines Bandscheiben-  
spezifischen Gewebetransplantates, welches autolog aus  
30 degenerierendem, vorgefallenen Bandscheibengewebe hergestellt  
wurde.

Die Gemisch-Bandscheibenzellen, die aus erkranktem  
Bandscheibengewebe isoliert werden und aus denen autologe  
35 3-dimensionale Bandscheibenzellaggregate hergestellt

5 werden, so dass die entnommenen Zellen in einem de novo synthetisierten Gewebe integriert sind, überleben auch mit fortschreitender Kultivierungsdauer, d. h. die Zellen im Inneren der Aggregate sterben nicht ab. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer differenzieren die  
10 Zellen im Inneren der Aggregate aus und es bilden sich Bandscheibenknorpelgewebe, die aus ECM, differenzierten Zellen und einer Proliferationszone am Rand bestehen (siehe Abb. 1). Während der Differenzierung in der autologen Zellkultur wird der Abstand der aggregierten Zellen durch  
15 Bildung der gewebespezifischen Matrix immer größer (siehe Abb. 3 Vergleich (3c) mit (3d)). Es entsteht im Inneren der in vitro hergestellten Bandscheibengewebe eine Gewebesthistologie, die dem natürlichen Gewebe sehr ähnlich ist. Während der weiteren Herstellung der Bandscheibenknorpelgewebe bildet sich die "Proliferationszone" am Rand  
20 selbiger aus. Diese Zone hat den unschätzbaren Vorteil, dass nach Einbringen der so entstandenen Bandscheibenknorpelgewebe in degenerierte Bandscheiben, die in dieser Randzone befindlichen Zellen in der Lage sind, auszuwandern und aktiv den Kontakt zum umliegenden Gewebe herzustellen  
25 bzw. eine Integration des in vitro gebildeten Bandscheibenknorpelgewebes in seine Umgebung ermöglichen. Damit sind die hergestellten gewebespezifischen Zellaggregate hervorragend zur Behandlung von degenerierten Bandscheiben und zum Neuaufbau von Bandscheibengewebe *in vivo* geeignet.  
30

Aufgrund der biomechanischen Belastung der Bandscheiben direkt nach Behandlung sowie dem Ziel die Bandscheibe in ihrer Höhe gleich mit der Transplantation des Bandscheibenknorpelgewebes wiederherzustellen, kann es von Vorteil  
35

5        sein, bereits größere und mechanisch stabile Gewebestücke  
zu transplantieren. Für diesen Fall werden mindestens zwei,  
besser aber mehr der erhaltenen in vitro Bandscheiben-  
knorpelgewebe fusioniert, indem sie gemeinsam unter den  
gleichen Bedingungen und in den gleichen Kulturgefäßen wie  
10        oben beschrieben bis zur gewünschten Größe weiterkultiviert  
werden (siehe auch Abb. 4).

Als Zellkulturmedium kann sowohl für die Suspensions- als  
auch für die Monolayerkultur übliches Medium, z. B.  
15        Dulbecco's MEM, unter Zusatz von Serum, verwendet werden.  
Vorzugsweise wird DMEM und Hams im Verhältnis 1:1  
eingesetzt. Um jedoch immunologische Reaktionen des  
Patienten auf das in vitro hergestellte Gewebe zu  
vermeiden, wird als Serum vorzugsweise autologes Serum des  
20        Patienten eingesetzt. Es ist auch möglich xenogenes oder  
allogenes Serum zu verwenden.

Dem Kulturmedium werden erfindungsgemäß keine Antibiotika,  
Fungistatika oder andere Hilfsstoffe zugesetzt. Es hat sich  
25        gezeigt, dass nur die autologe oder allogene Kultivierung  
der Zellen und Zellaggregate sowie die Kultivierung ohne  
Antibiotika und Fungistatika eine unbeeinflusste  
Proliferation sowie Differenzierung der Zellen in der  
Monolayerkultur und eine ungestörte Bildung der spezi-  
30        fischen Matrix in den Zellaggregaten ermöglicht. Weiterhin  
sind durch den Verzicht von Zusatzstoffen während der  
Herstellung nach Einbringen des in vitro hergestellten  
Gewebes in den menschlichen und auch tierischen Organismus  
immunologische Reaktionen ausgeschlossen.

5 Die Größe der hergestellten Bandscheibengewebe hängt von  
der eingebrachten Zellzahl pro Volumen Kulturmedium ab.  
Werden beispielsweise  $1 \times 10^7$  Zellen in 300  $\mu\text{l}$  Kulturmedium  
eingebracht, so entstehen innerhalb von 1 Woche dreidi-  
mensionale Bandscheibenzellaggregate von ca. 500-700  $\mu\text{m}$   
10 Durchmesser. Die andere Möglichkeit ist die in vitro-Fusion  
der kleinen Zellaggregate zu größeren - wie oben  
beschrieben - und das Einbringen dieser in die Bandscheibe.  
Vorzugsweise werden erfindungsgemäß zwischen  $1 \times 10^4$  und  
 $1 \times 10^7$  Zellen in 300  $\mu\text{l}$  Kulturmedium zur Herstellung der  
15 kleinen Zellaggregate verwendet, besonders bevorzugt  
 $1 \times 10^5$  Zellen. Die nach einigen Tagen gebildeten in vitro  
Bandscheibengewebe werden dann für mindestens 2-4 Wochen in  
Abhängigkeit von der Zellart und den patientenspezifischen  
Charakteristika in dem geeigneten Kulturmedium kultiviert,  
20 um die Ausbildung der gewebespezifischen Matrix zu  
induzieren. Im besonderen Falle können dann einzelne in  
vitro Bandscheibengewebe ab ca. einer Woche Kultivierung  
fusioniert werden, um die Größe des Gewebestückes zu  
erhöhen.

25 Als Zellkulturgefäße kommen für die erfindungsgemäße  
Kultivierung in Suspension bevorzugt solche mit  
hydrophober, also adhäsionsverhindernder Oberfläche, in  
Betracht, wie z. B. Polystyrol oder Teflon. Zellkultur-  
gefäße mit nichthydrophober Oberfläche können durch  
30 Beschichten mit Agar oder Agarose hydrophobiert werden.  
Weitere Zusätze sind nicht erforderlich. Vorzugsweise  
dienen als Zellkulturgefäße Napfplatten. Dabei können für  
die Herstellung der kleinen Zellaggregate beispielsweise



5        96-Napfplatten und für die Herstellung der fusionierten  
Aggregate 24-Napfplatten Verwendung finden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die operative Technik zur  
Transplantation der Bandscheibenzellen und der in vitro  
10        hergestellten 3-dimensionalen Bandscheibenknorpelgewebe in  
die geschädigte Bandscheibe. Erfindungsgemäß wird die  
Transplantation durch Injektion der Bandscheibenzellen  
unter fluoroskopischer Kontrolle nach Desinfektion der  
Haut, steriler Abdeckung des Hautareals und unter  
15        Lokalanästhesie und bevorzugt unbedingt unter Vermeidung  
der Verwendung von Kontrastmitteln durchgeführt.

Dazu werden die Bandscheibenzelltransplantate insbesondere  
nach deren Herstellung im Labor in speziellen Transport-  
20        röhrrchen mit sich verjüngendem Boden, abgerundet oder  
spitz, eingefüllt und im Operationsraum mittels einer  
Punktionsnadel mit z.B. schrägem Kanülenausgang in eine  
Spritze aufgezogen. Vor allem durch den schrägen Boden des  
Transportgefäßes und den schrägen Kanülenausgang ist eine  
25        vollständige Aufnahme der Zellen enthaltenden Lösung  
möglich. Zur Sicherstellung der Abgabe der Zellen in die  
Bandscheibe ohne Schädigung der Zellen und mit kleinst-  
möglichem Flüssigkeits- und somit Zellverlust hat die  
Punktionsnadel im Wesentlichen einen Innendurchmesser von  
30        0,4 bis 2 mm. Die Transplantation durch Injektion der  
Bandscheibenzellen in die zu behandelnde Bandscheibe  
erfolgt nach der hier vorliegenden Erfindung im Speziellen  
auf der gegenüberliegenden Seite der zuvor operierten Seite  
der Bandscheibe (Bandscheibenvorfallentfernung) mittels  
35        einer Punktionsnadel mit schrägem Ausgang. Erfindungsgemäß

5        findet die Injektion des Zelltransplantates unter  
fluoroskopischer Kontrolle statt, da die tatsächliche  
Abgabe der Zellen in den Bandscheibeninnenraum kontrolliert  
werden muss. Herkömmlicherweise können Kontrastmittel  
verwendet werden, die jedoch die Zellen schädigen, wodurch  
10        der Erfolg der Zelltransplantation verhindert wird. Nach  
Abgabe der Bandscheibenzellen in den Bandscheibenraum wird  
die Punktionsnadel aus der Bandscheibe heraus gezogen. Für  
den Patienten erfolgt bevorzugt eine 12-stündige strikte  
Bettruhe, eine folgende 12-24-stündige reguläre Bettruhe  
15        und eine 24-48-stündige Bettruhe mit physiotherapeutischen  
Übungen. Anschließend erfolgt z.B. für einige Wochen die  
Stabilisierung der Wirbelsäule über eine herkömmliche  
geeignete Orthese.

20        Die Transplantation der 3-dimensionalen, in vitro  
hergestellten Bandscheibenknorpeltransplantate erfolgt wie  
für die Bandscheibenzellen insbesondere mittels einer  
Punktionsnadel. Zur Sicherstellung der Vermeidung einer  
mechanischen und damit biologischen Schädigung der  
25        Bandscheibenknorpeltransplantate während der Injektion,  
wird eine Punktionsnadel mit einem Durchmesser von  
mindestens 500µm verwendet. Weiterhin erfolgt  
erfindungsgemäß zur Vermeidung der mechanischen Schädigung  
der Bandscheibenknorpeltransplantate im Wesentlichen nur  
30        ein einmaliges Passieren durch die Punktionsnadel. Deshalb  
werden die Bandscheibenknorpeltransplantate nach deren  
Herstellung im Labor bereits in eine Spritze überführt, auf  
die dann im Operationssaal nur noch die Punktionsnadel  
aufgesetzt wird. Auch hier muss die Punktionsnadel  
35        erfindungsgemäß einen schrägen Auslauf aufweisen, um durch

5 die vergrößerte Ausgabefläche ein schnelles Abgeben der Bandscheibenknorpeltransplantate im kleinstmöglichen Flüssigkeitsvolumen (Abgabevolumen) zu ermöglichen. Anschließend erfolgt die Injektion wie oben für die Zelltransplantate beschrieben.

10 Gegenstand der Erfindung sind auch therapeutische Zubereitungen, die die erfindungsgemäßen Bandscheibenzelltransplantate und das Bandscheibenknorpelgewebe umfassen, z.B. Injektionslösungen.

15 Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Bandscheibenknorpelgewebe zur Testung von Wirkstoffen, die z. B. die Bildung und Differenzierung von Matrix und Zellen beeinflussen. Dazu werden die Bandscheibenzellaggregate erfindungsgemäß hergestellt und  
20 in unterschiedlichen Reifestadien werden die zu testenden Medikamente hinzugegeben und unterschiedlichste Parameter der in vitro Bandscheibengewebeherstellung und -reifung charakterisiert. Diese Tests sind im Vergleich zu den  
25 herkömmlichen Medikamententests an Tieren oder Tumorzellsystemen durch die Verwendung von nur autologem Material patientenspezifisch und ermöglichen eine individuelle Diagnose.

30 Nachfolgend soll die Erfindung an Ausführungsbeispielen näher erklärt werden, ohne sie darauf einzuschränken.

### **Ausführungsbeispiele**

35 Beispiel 1: Herstellung von Bandscheibenzelltransplantaten

5

Aus dem erkrankten Bandscheibengewebe werden mittels enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit Kollagenaselösung die Bandscheibenknorpelzellen aus dem Anulus Fibrosus und Nucleus Pulposus isoliert. Nach  
10 Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Gewebe, werden diese als Gemischzellpopulationen in Zellkulturflaschen überführt und unter Zugabe von DMEM / Hams F12 Kulturmedium (1/1) und 10% autologem Serum des Patienten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zweimal  
15 wöchentlich wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden die Bandscheibenzellen in  
20 physiologische Kochsalzlösung überführt und zur Transplantation zur Verfügung gestellt.

In einem in vitro Model konnte das Differenzierungspotential der im Zelltransplantat enthaltenen  
25 Bandscheibenzellen aufgezeigt werden. Es werden bandscheibenspezifische Matrixproteine und Markerproteine exprimiert (Abb. 3) und damit eine bandscheibenspezifische Gewebestruktur aufgebaut.

### 30 Beispiel 2: Transplantation von Bandscheibenknorpelzellen

Die in Beispiel 1 hergestellten Bandscheibenzelltransplantate (mind. 1.000 Zellen, max. 100 Millionen Zellen) vorzugsweise ca. 1 Million  
35 Bandscheibenknorpelzellen wurden in physiologischer

5 Kochsalzlösung aufgenommen und in die erkrankte Bandscheibe  
eingespritzt. Es wurde unter anderem festgestellt, dass in  
der behandelten Bandscheibe der Wassergehalt wieder  
ansteigt, sowie die Höhe des Zwischenwirbelraumes  
aufrechterhalten werden kann, was beides auf die durch die  
10 Bandscheibenknorpelzellen synthetisierten Matrixproteine  
zurückzuführen ist.

Die erfindungsgemäße in vitro hergestellte  
Bandscheibenzelltransplantate werden von den Patienten  
15 angenommen, gewährleisten eine schnelle Integration der  
proliferationsfähigen und migrationsfähigen Zellen sowie  
eine Regeneration des Bandscheibengewebes durch die  
Differenzierungsfähigkeit der enthaltenen Zellen. Somit  
erlauben die Bandscheibenzelltransplantate den schnellen  
20 Wiederaufbau von Bandscheibengewebe, eine schnelle Genesung  
der Patienten und die Wiederherstellung der Band-  
scheibenfunktion.

### 25 Beispiel 3: in vitro Herstellung von Bandscheibenknorpel- gewebe

Aus dem vorgefallenen Bandscheibengewebe werden mittels  
enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit  
Kollagenaselösung die Bandscheibenknorpelzellen aus dem  
30 Anulus Fibrosus und Nucleus Pulposus isoliert. Nach  
Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Gewebe,  
werden diese als Gemischkultur in Zellkulturflaschen  
überführt und unter Zugabe von DMEM / Hams F12 Kulturmedium  
(1/1) und 10% autologem Serum des Patienten bei 37°C und 5%  
35 CO<sub>2</sub> inkubiert. Zweimal wöchentlich wird ein Mediumwechsel

5 durchgeführt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden  $1 \times 10^5$  Zellen in je ein Zellkulturgefäß überführt, das mit Agarose beschichtet  
10 ist. Nach einem Tag haben sich die ersten Zellen in Aggregaten angeordnet. Diese Aggregate werden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und für mindestens 2 Wochen kultiviert.

15 Den Aufbau der erhaltenen Bandscheibenknorpelgewebe verdeutlicht die mikroskopische Aufnahme in Abb. 1, die den Querschnitt eines erfindungsgemäß hergestellten Bandscheibengewebes mit ECM als Zone verminderter Proliferation und Bildung von gewebespezifischen  
20 Matrixproteinen und P als äußere Proliferationszone zeigt.

In diesen *in vitro* Bandscheibengeweben wurde die Expression und Deposition von bandscheibenspezifischen Matrixbestandteilen und regulatorische Proteine wie Aggrecan  
25 (Abb. 3a), hyalin-spezifische Proteoglykane (Abb. 3b), Kollagen Typ I (Abb. 3c), Kollagen Typ II (Abb. 3d) und Kollagen Typ III (Abb. 3e) nachgewiesen. Diese sind Bestandteile des nativen Bandscheibenknorpelgewebes *in vivo* und stellen die wichtigsten Strukturproteine dar, die für  
30 die Funktion des Bandscheibenknorpels von entscheidender Bedeutung sind.

Es war überraschend, dass die aus dem erkrankten Bandscheibengewebe isolierten Bandscheibenzellen, wenn  
35 diese als Gemisch aus Anulus Fibrosus und Nucleus Pulposus

5 kultiviert werden, eine hohe Proliferationskapazität  
(Abb. 2) sowie ein sehr hohes Differenzierungspotential zur  
Bildung bandscheibenspezifischer Matrixproteine und  
regulatorischer Proteine aufweisen (siehe auch Abb. 3) und  
ihre Eigenschaften durch das Prozedere des Einfrierens und  
10 Auftauens erhalten werden können (siehe auch Abb. 5).

#### Beispiel 4: Transplantation von Bandscheibenknorpelgewebe

Das in Beispiel 3 hergestellte Bandscheibenknorpelgewebe  
15 (ca. 10 bis 1000 Gewebestückchen aus je  $1 \cdot 10^5$  Zellen)  
vorzugsweise 100 Gewebestückchen wurde in physiologischer  
Kochsalzlösung bereits im Labor in eine Spritze aufgenommen  
und in den Zwischenwirbelraum von erkrankten oder  
geschädigten Bandscheiben mittels einer Punktionsnadel mit  
20 angeschrägtem Auslauf eingespritzt. Das erfindungsgemäß in  
vitro hergestellte Bandscheibenknorpelgewebe wird von den  
Patienten angenommen und gewährleistet neben der Erfüllung  
der mechanischen Funktion des hergestellten Gewebes die  
schnelle Integration der hergestellten Gewebestücke durch  
25 die proliferationsfähigen und migrationsfähigen Zellen in  
der äußeren Schicht der Aggregate sowie eine Regeneration  
des Bandscheibengewebes durch die Differenzierungsfähigkeit  
der enthaltenen Zellen. Somit erlaubt die Struktur und  
Funktion der Gewebestücke den schnellen Wiederaufbau von  
30 Bandscheibengewebe, eine schnelle Genesung der Patienten  
und die Wiederherstellung der Bandscheibenfunktion.

Abb. 4 zeigt fünf fusionierende Bandscheibengewebe. Es ist  
zu sehen, dass die Gewebekugeln aneinander haften und  
35 sozusagen verschmelzen, die Grenze zwischen zwei

5 Bandscheibengewebe ist nicht mehr zu erkennen. Nach  
längerer Kultivierungszeit fusionieren die  
Bandscheibengewebe vollständig und es entsteht ein größeres  
in vitro Gewebestück. Der Aufbau der so erhaltenen größeren  
Zellaggregate ist mit in vitro Bandscheibengewebe  
10 vergleichbar. Sie können bis zu maximal 99% ECM beinhalten  
und die enthaltenen Zellen sind vital.



5      **Patentansprüche**

1. Verwendung von degeneriertem, vorgefallenem Bandscheibengewebe zur Herstellung eines therapeutischen Mittels zur Behandlung von Bandscheibendefekten.  
10
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die aus dem degenerierten, vorgefallenen Bandscheibengewebe isolierten Bandscheibenzellen während der Vermehrung in einem Zellkulturmedium, das 1-20% autologen Serumzusatz enthält und dessen Verhältnis von alpha-MEM-Medium und HAM-F12-Medium zwischen 2:1 und 1:2 beträgt, und bei 36.8-37°C, 5% Kohlendioxid Luftanteil und einer Luftfeuchte von 85-95% kultiviert sind.  
15  
20
3. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die isolierten Bandscheibenzellen nach ihrer Vermehrung in Monolayer in einem Zellkulturmedium, das 1-20% autologen Serumzusatz enthält und dessen Verhältnis von alpha-MEM-Medium und HAM-F12-Medium zwischen 2:1 und 1:2 beträgt, und bei 36.8-37°C, 5% Kohlendioxid Luftanteil und einer Luftfeuchte von 85-95% kultiviert und dadurch differenzierungsfähig sind und Matrixstrukturen bilden, die spezifische Bandscheibenmatrixproteine umfassen.  
25  
30

- 5        4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die isolierten Bandscheibenzellen nach deren Vermehrung  
in Monolayer in einer Lösung aus 10 % DMSO, 20 % Serum  
und 70 % Kulturmedium eingefroren und wieder aufgetaut  
10 werden und so deren Eigenschaften im Hinblick auf die  
Synthese von spezifischen Matrixkomponenten und Markern  
nicht verändern und Gewebestrukturen in vitro und in  
vivo aufbauen, die aus Bandscheiben-spezifischen  
Matrixproteinen bestehen.
- 15        5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die aus dem Bandscheibengewebe isolierten Zellen in  
einem Kulturgefäß mit hydrophober Oberfläche und sich  
20 verjüngendem Boden kultiviert und so dreidimensionale  
Zellaggregate erhalten werden.
- 25        6. Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenzelltrans-  
plantaten,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
aus vorgefallenem degeneriertem Bandscheibengewebe  
und/oder erkranktem Bandscheibengewebe,  
Bandscheibenzellen isoliert und unter Zusatz von  
körpereigenem Serum als dreidimensionalen Aggregate  
30 kultiviert und so dreidimensionale  
Bandscheibengewebetransplantate erhalten werden..
7. Bandscheibengeweberegenerationsmittel erhältlich  
dadurch, dass

- 5           aus degeneriertem Bandscheibengewebe Zellen isoliert,  
          kultiviert, geerntet und als Bandscheibenregenerations-  
          mittel verwendet werden.
8.   Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
10       dadurch gekennzeichnet, dass  
          mehrere Gewebe miteinander fusioniert sind.
9.   Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
          dadurch gekennzeichnet, dass  
15       das Mittel ein Gemisch aus kultivierten Zellen und dem  
          dreidimensionalen Gewebe ist.
10. Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
          erhältlich dadurch, dass die Bandscheibenzell-  
20       transplantate in einem Gefäß mit sich verzweigendem  
          Boden und die Bandscheibengewebeaggregate in einer  
          Spritze zur Transplantation vorliegen und mittels einer  
          Punktionsnadel mit angeschrägtem Auslauf in die zu  
          behandelnde Bandscheibe auf der entgegengesetzten Seite  
25       der ersten Operation der Bandscheibe durch Injektion  
          transplantiert werden.
11. Verwendung der Mittel nach einem der Ansprüche 7 - 10  
          zur Testung von Wirkstoffen.
- 30
12. Zelltherapeutische Zubereitungen umfassend  
          Bandscheibenregenerationsmittel gemäß einem der  
          Ansprüche 7 bis 10.

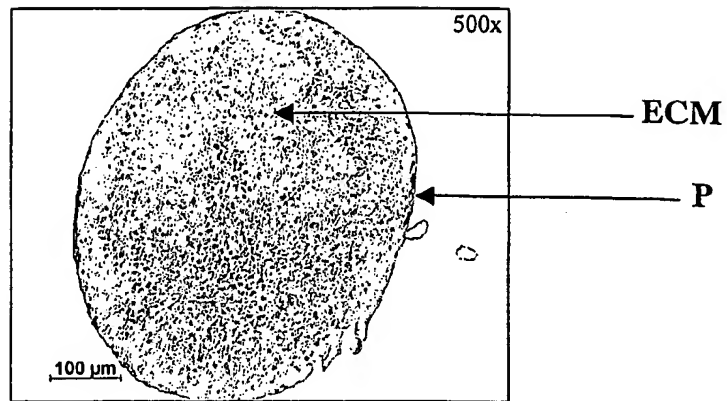


Abb. 1: Histologie von in vitro hergestellten, 3-dimensionalen Bandscheibenknorpelgeweben. Im Inneren der Gewebe befinden sich vitale differenzierte Zellen, die eine extrazelluläre Matrix (ECM) ausgebildet haben. Am Rand befindet sich eine Proliferationszone (P).

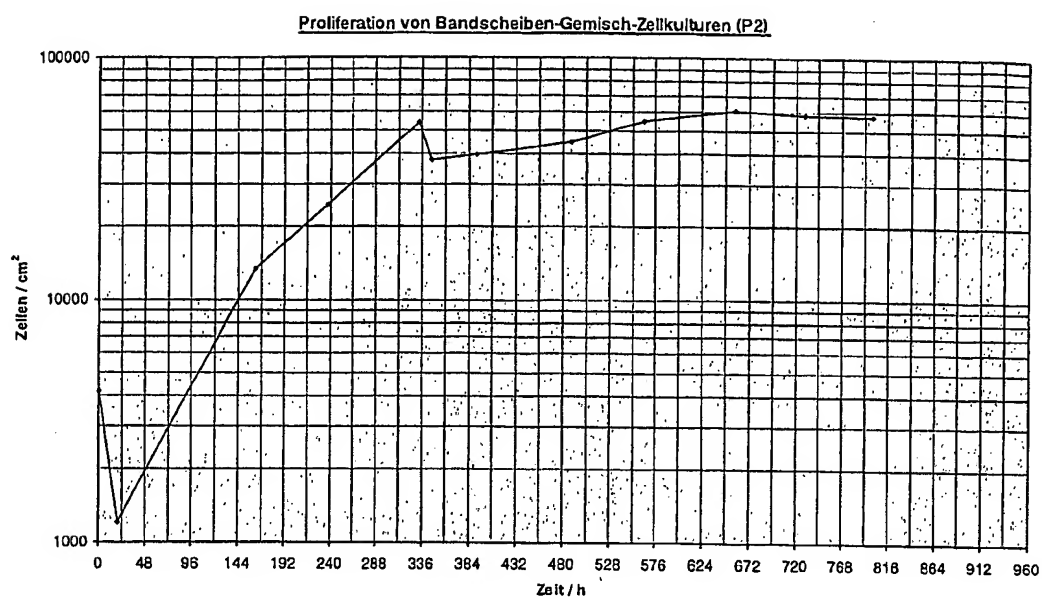


Abb.2: Proliferation von Bandscheibenzellen in Gemisch-Kultur in der Monolayer-Passage 2.

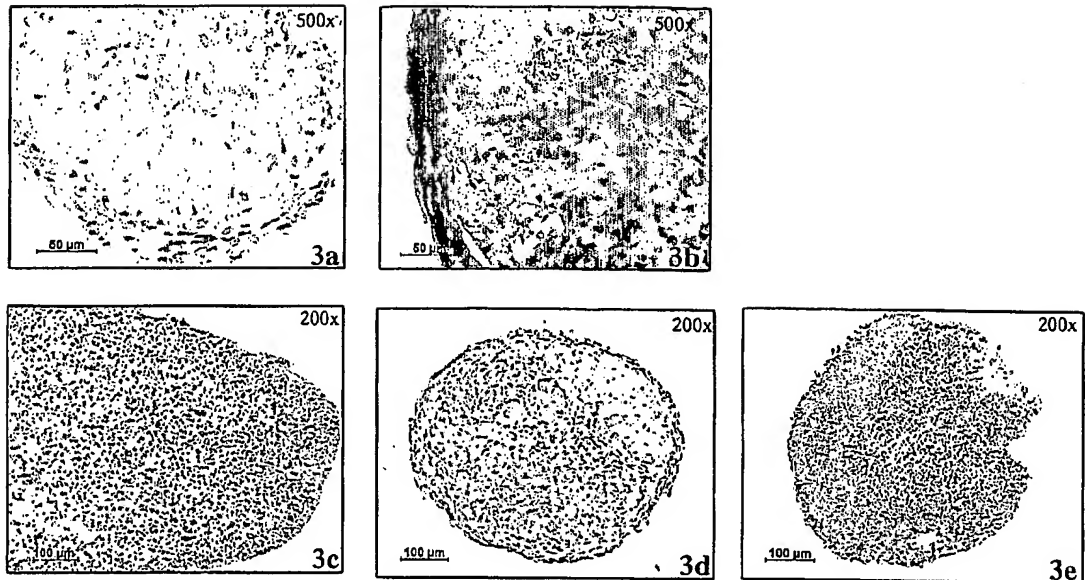


Abb. 3: Expression von Matrixproteinen durch Gemisch-Bandscheibenknorpelzellen nach Vermehrung in Monolayerkultur und anschließender Kultivierung unter 3-dimensionalen Zellkulturbedingungen. (3a) Expression von Aggrekan nach 4 Wochen, (3b) Expression von hyalinspezifischen Proteoglykanen nachgewiesen mittels SafraninO-Färbung nach 4 Wochen, (3c) Expression von Kollagen Typ I nach 2 Wochen, (3d) Expression von Kollagen Typ II nach 4 Wochen, (3e) Expression von Kollagen Typ III nach 4 Wochen.

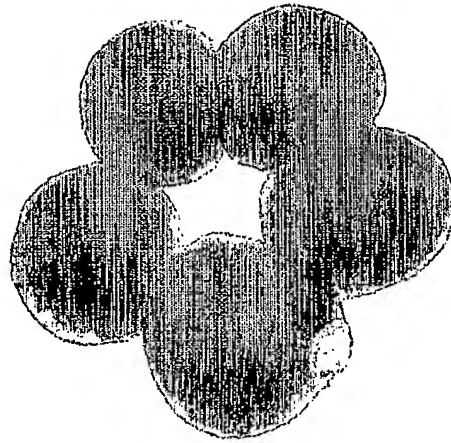


Abb.4: 5 Fusionierende 3-dimensionale Bandscheiben-Knorpelgewebe.

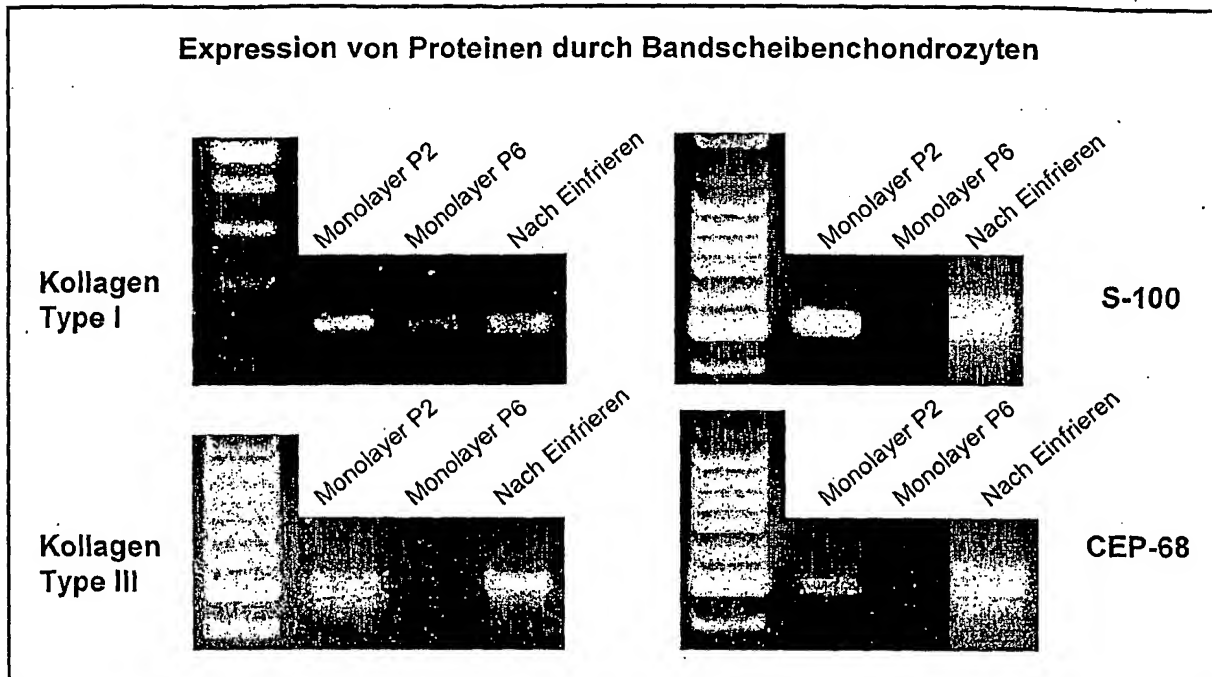


Abb. 5: Expression von verschiedenen Matrixproteinen und regulatorischen Proteinen durch Bandscheibenknorpelzellen, die in Monolayer für verschiedene Passagen kultiviert wurden und nach Einfrieren und Auftauen erneut in Monolayer kultiviert wurden. Monolayer Passage 2 (P2), Monolayer Passage 6 (P6), nach Einfrieren und Auftauen (nach Einfrieren).



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**